Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 4, Oct- Nov 2018, p.657-670

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 4، مهر - آبان 1397، ص. 670-657

اثر ضدمیکروبی فیلم زیست تخریب‌پذیر بر پایه کنسانتره پروتئین آب پنیرحاوی اسانس صمغ درخت بنه (*Pistacia atlantica* Subsp. *Kurdica*) بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*

سمیرا عباسپور منجزی[1]- محمدرضا عدالتیان دوم[2*]- محمدباقر حبیبی نجفی[3]- آرش کوچکی[3]

تاریخ دریافت: 1396/02/17
تاریخ پذیرش: 1396/06/20

چکیده

در این پژوهش، استفاده از اسانس صمغ بنه به‌عنوان نگهدارنده‌ای طبیعی در فرمولاسیون فیلم زیست تخریب‌پذیر بر پایه کنسانتره پروتئین آب پنیر علیه کپک *پنی سیلیوم اکسپانسوم* ارزیابی شد. اسانس صمغ بنه استخراج شد. سپس اثر ضدمیکروبی با اندازه‌گیری حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی Minimum Inhibitory Concentration در برابر *پنی سیلیوم اکسپانسوم* در غلظت‌های صفر، ۵۰۰، ۱۰۰۰، 1500، 2000، 2500، ۳۰۰۰، ۳۵۰۰ و 4000 پی‌پی‌ام، و حداقل غلظت قارچ‌کشی Minimum fungicidal Concentration نیز بررسی شد. تمام غلظت‌ها، اثر ضدکپکی معناداری از خود نشان داد (P<0.05). فیلم پروتئین آب پنیر با افزودن اسانس صمغ بنه در غلظت‌های (۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام) تهیه گردید، این فیلم بر روی محیط کشت Potato Dextrose Agar در مقابل *پنی سیلیوم اکسپانسوم*، اثر ضدکپکی نشان داد که به‌طور معنی‌داری افزایش اسانس باعث افزایش قطر هاله ضدکپکی شد (P<0.05). افزایش غلظت اسانس در فیلم، باعث افزایش ضخامت گردید ولی این افزایش معنادار نبود و تغییری در میزان شفافیت ایجاد نکرد. حلالیت در آب به‌طور معناداری تا 22/69 درصد کاهش یافت (P<0.05). افزودن اسانس باعث کاهش میزان نفوذپذیری فیلم‌ها به بخار آب از 21/62 به 14/27 gmm/mdkPa شده و مقدار کاهش، تابعی از غلظت اسانس بود (P<0.05). افزودن اسانس تا غلظت 4000 پی‌پی‌ام، مقاومت به کشش به‌طور معنی‌داری کاهش و درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی تا 36/9 میلی‌متر افزایش یافت (P<0.05). افزودن اسانس صمغ بنه به فرمولاسیون فیلم، توانست خواص فیزیکی و مکانیکی فیلم مانند مقاومت به رطوبت‌پذیری، مقاومت به کشش و درصد ازدیاد طول را بهبود بخشد. این فیلم در غلظت 4000 پی‌پی‌ام اسانس، اثر ضدقارچی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اسانس بنه، پروتئین آب پنیر، اثر ضدمیکروبی، فیلم

مقدمه

جنس *Pistacia* L. شامل 11 گونه بوده که اکثر آن‌ها معروف و مشهور به تولید اولئورزین هستند. سه نوع پسته در ایران وجود دارد که شامل *P.vera*، *P.atlantica* و *P.khinjuk* می‌باشد. چهار زیرگونه یا واریته برای *P.atlantica* به نام‌های cabulica، kurdica، mutica و atlantica شناسایی شده است (Farhoosh *et al.*, 2008). اولئورزین واریته mutica، که معروف به Turk terebinth gum می‌باشد در تولید آدامس در ایران استفاده می‌شود. بنه (*PistaciaAtlantica*) درختی از گونه درختان خانواده آنکاردیاسه[4] است(Hatamnia *et al.*, 2014). گزارش شده است که اسانس صمغ (رزین) بنه دارای فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی قابل توجه در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد (Delazar *et al.*, 2004). اثر ضدمیکروبی اسانس صمغ بنه به دلیل وجود ترکیباتی مانند آلفاپینن[5] و بتاپینن[6] می‌باشد (Barrero *et al.*, 2005). مقادیر زیادی الفاپینن، در اسانس روغنی حاصل از صمغ *P. atlantica* var. *mutica* (Delazer *et al.*, 2004)، *P. atlantica* var. *kurdica* (Sharifi *et al.*, 2011)، *P. lentiscus* (Mgiatis *et al.*, 1999)، *P.khinjuk* (Castola *et al.*, 2000؛ Monaco *et al.*, 1982)، *P. vera* (Alma *et al.*, 2004؛ Ramezani *et al.*, 2004) شناسایی و یافت شد. اسانس روغنی *P. atlantica* همچنین دارای پتانسیل

1، 2 و 3- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*مسئول مکاتبات: Email: edalatian@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v1396i0.64251

4 Anacardiaceae
5 α-pinene
6 β pinene

کاربرد به‌عنوان یک عامل ضدمیکروبی در فیلم‌ها می‌باشد (Taran *et al.*, 2010).

فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر عموماً از پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها و چربی‌ها، به‌صورت مجزا یا در ترکیب با یکدیگر تولید می‌شوند. فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر بر پایه پروتئینی به‌واسطه خواص تغذیه‌ای آن‌ها و بهتر بودن ویژگی‌های مکانیکی و ممانعت‌کنندگی در برابر نفوذ گازها درمقایسه با فیلم‌های لیپیدی و پلی‌ساکاریدی همواره مورد توجه ویژه‌ای قرار داشته‌اند (Barrero *et al*., 2005). همچنین فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر بر پایه پروتئین آب پنیر، خصوصیات مکانیکی و ممانعت‌پذیری بهتری در مقایسه با سایر انواع فیلم‌های بر پایه پروتئین (زئین ذرت، گلوتن گندم و پروتئین ایزوله سویا) یا فیلم‌های بر پایه پلی‌ساکارید (نشاسته، سلولز، کاراژینان و پکتین) از خود نشان داده‌اند و تا حدودی قابل مقایسه با بهترین فیلم‌های پلیمری سنتزی در بازار هستند (Ramos *et al*., 2012). هرچند که خصوصیات ممانعت‌پذیری نسبت به رطوبت و خواص مکانیکی این قبیل فیلم‌ها دارای محدودیت هایی است که به‌منظور برطرف ساختن این موانع و معایب، پلاستیسایزرها (از قبیل سوربیتول یا گلیسرول) برای بهبود مقاومت در برابر انتقال رطوبت، به فیلم افزوده می‌گردد. Seydim & Sarikus (2006) فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های حاصل از پروتئین‌های آب پنیرحاوی سه روغن اساسی اورگانو[1]، رزماری[2] و سیر را مورد بررسی قرار دادند. این محققان اثر ضدمیکروبی فیلم‌های حاوی 4-1 درصد وزنی– حجمی از اسانس‌های روغنی نامبرده را در مقابل 5 باکتری *اشریشیاکلی* O157:H7 (ATCC35218)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC 43300)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (NCTC2167)، *سالمونلا اینتریتیدیس* (ATCC 13076) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (DSM20174) آزمایش کردند . نتایج به‌دست آمده با کمک روش دیسک‌های انتشاری نشان دادکه فیلم‌های ضدمیکروبی حاوی اسانس روغنی اورگانو در غلظت 2 درصد نسبت به انواع فیلم‌های حاوی روغن‌های سیر و رزماری علیه میکروارگانیسم‌های مورد آزمون موثرترین بودند ($p<0.05$). برزگر و همکاران (1396)، خواص فیزیکی و ضدمیکروبی فیلم خوراکی کیتوزان حاوی اسانس صمغ بنه را مورد ارزیابی قرار دادند.

قارچ‌ها به‌عنوان عوامل مولد فساد مواد غذایی انسان و دام در طول نگهداری، شناخته می‌شوند که از طریق تولید مایکوتوکسین‌ها، باعث نامناسب شدن برای مصرف انسان و دام می‌شود (Kumar *et al.*, 2007).

پنی‌سیلیوم اکسپانسوم به‌عنوان عامل فساد پس از برداشت میوه‌جات به‌خصوص در میوه سیب حائز اهمیت است. با توجه به بررسی‌های به‌عمل آمده، تاکنون پژوهشی روی اثر ضدقارچی اسانس صمغ بنه در فیلم زیست تخریب‌پذیر بر پایه کنسانتره پروتئین آب پنیر صورت نپذیرفته است، لذا هدف اصلی از انجام این پژوهش، بررسی فعالیت ضدکپکی اسانس صمغ بنه در ترکیب با فیلم زیست تخریب‌پذیر کنسانتره پروتئین آب پنیر (WPC) بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و بررسی برخی خصوصیات فیزیکی، مکانیکی فیلم تولیدی به تنهایی و در ترکیب با سطوح مختلف اسانس بنه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کنسانتره پودر آب پنیر (WPC) با مقدار پروتئین 70% (شرکت شیر مولتی، ایران)، صمغ درخت بنه (شرکت سقز سازی کردستان، ایران)، امولسیفایر توئین 80 وگلیسرول و محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) (مرک، آلمان) و کپک *پنی سیلیوم اکسپانسوم* (PTCC 89046) (مرکز کلکسیون قارچها وباکتری‌های سازمان پژوهشهای صنعتی ایران، ایران) تهیه شد.

اسانس‌گیری از صمغ درخت بنه

برای اسانس‌گیری از روش تقطیر با آب (Water distillation) به‌وسیله دستگاه کلونجر انجام شد. بدین ترتیب که 100گرم از صمغ در بالن دستگاه قرار داده شد. سپس دو سوم حجم بالن با آب مقطر پر شد و حرارت داده شد. پس از به‌دست آمدن اسانس مقدار کمی سولفات سدیم (Na_2So_4) بدون آب جهت جذب آب و مقدار کمی رطوبت که همراه اسانس است اضافه گردید. سپس اسانس را از صافی پنبه یا پشم شیشه عبور داده شد. در نهایت آن را در یک ظرف تیره ریخته و درپوش آن بسته شد و در دمای 2تا4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (بخردی و خیاط کاشانی، 1385).

تهیه فیلم زیست تخریب‌پذیر از کنسانتره پودر پروتئین آب پنیر (WPC)

ابتدا محلول 10درصد (وزنی/وزنی) از پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر در آب مقطر تهیه گردید. جهت انحلال کامل پودر کنسانتره پروتئین آب پنیر به مدت 1ساعت بر شیکر با 180 دور در دقیقه هم‌زده شد و به‌وسیله pHمتر؛ pHمحلول، روی 7 تنظیم گردید (Pérez-Gago and Krochta, 1999)، سپس محلول تهیه شده به مدت 30دقیقه درون بن ماری در دمای 90 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و توسط ظرف محتوی یخ سرد گردید. بعد از آن گلیسرول به‌عنوان نرم‌کننده به میزان برابر با پودر کنسانتره پروتئینی آب پنیر (وزنی/وزنی) به محلول اضافه گردید (Bahram *et al*., 2014) و به مدت 10دقیقه روی شیکر با 140دور در دقیقه هم‌زده شد تا محلول یکنواختی به‌دست آید. سپس قبل از افزودن اسانس به محلول، توئین

---
1 Oregano

2 Rosemary

80 به‌عنوان امولسیفایر به میزان 0/2درصد حجم اسانس بـه محلـول اضافه شد و بـه مـدت 30 دقیقـه بـه آرامـی هـم‌زده شـد و سـپس غلظت‌هـای (1000، 2000، 3000، 4000 پـی‌پـی‌ام) از اسـانس بـه محلول اضافه گردید و به مدت 2 دقیقه هم‌زده شد. همچنین جهـت نمونه کنترل، فیلم دارای تویین و بدون اسانس و همچنین فیلم بدون اسانس و بدون تویین نیز تولید شد. محلول بـه مـدت 24 سـاعت در یخچال (دمای 4 درجه سانتی‌گراد) قرار داده می شـود تـا هـواگیری به‌طور کامل انجام شود. برای خارج شدن حلال (آب)، 160 گرم از هر محلول درون پلیت‌های شیشه ای با قطر 14 ×14 ریخته شد و سپس پلیت‌ها در یک سـطح کـاملا تـراز در آون در دمـای 50-45 درجـه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا خشک شده و فیلم تهیـه شـود (Chae & Heo, 1997؛ Bahram *et al*., 2014).

آماده‌سازی و اندازه‌گیری ویژگی‌های فیلم

اندازه‌گیری ضخامت و دانسیته

ضخامت فیلم‌های تولیدی توسط میکرومتر دیجیتال مدل QLR digit-IP54,China در 5 نقطه از نمونه‌های فیلم اندازه‌گیـری شـد. برای تعیین دانسیته نیز، قطعات مستطیل شکل از فیلم‌ها به ابعاد 3×2 سانتی‌متر تهیه شده و به مدت 10 روز در دسیکاتور حاوی سـلیکاژل در دمای 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ضخامت آن‌ها در 5 نقطه (4نقطه در پیرامون و یک نقطه در مرکز) اندازه‌گیـری شـده و قطعات با استفاده از ترازوی با دقت 0/0001 توزین شدند. دانسیته از تقسیم وزن نمونه‌ها بر ابعاد (حجم)، رابطه (1) ρ=m/v محاسبه شـد (Muller *et al*., 2008).

حلالیت در آب

میزان حلالیـت فـیلم‌هـا در آب بـا اسـتفاده از روش Romero-Bastida و همکاران (2005) تعیین شد. به این منظور قطعـات 3×2 سانتی‌متری از هر فیلم برش داده شد و در دسیکاتور حاوی سیلیکاژل (رطوبت نسبی صفر) به مدت 7روز نگهداری گردید. پس از طی ایـن مدت نمونه‌ها با دقت 0/0001 وزن شدند و در بشرهای محتـوی 80 میلی‌لیترآب مقطر قرارگرفتند. مقدار 0/02 سدیم آزید برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها به آب مقطر اضافه گردید. نمونه‌ها به مـدت 24 ساعت بـرروی شـیکر بـا 70 دور در دقیقـه در دمـای 25 درجـه سانتی‌گراد همزده شدند. سپس قطعات باقیمانده فیلم درآون 60 درجه تا رسیدن به وزن ثابـت خشـک شـده و مجـددا وزن شـدند. درصـد حلالیت با استفاده ازفرمول زیر محاسبه گردید:

(2)   100× وزن اولیه/ (وزن اولیه- وزن نهایی) = درصد حلالیت

پایداری در محلول‌های اسیدی و قلیایی

به‌منظور تعیین میزان مقاومت در فیلم‌ها در محلول‌های اسیدی و قلیایی، روش مشابه تعیین حلالیت فیلم‌ها در آب عمل گردید. به این منظور قطعات با ابعاد یکسان از فیلم‌ها تهیه گردید. نمونه‌هـا پـس از تـوزین بـا دقـت 0/0001، در ارلـن‌هـای محتـوی 25 میلـی‌لیتـری محلول‌های 0/1 نرمال هیدروکسید سدیم یا اسـید کلریـدریک قـرار گرفتند و به‌طور مداوم به مدت یک ساعت بر روی شـیکر بـا دور 50 دور در دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به هم‌زده شدند (Hu & Chen, 2009). قطعات باقیمانده فـیلم بـا کمـک فیلتـر کاغـذی از محلـول جـدا شـده و تـا رسـیدن بـه وزن ثابـت در آون 60 درجـه سانتی‌گراد خشک و سپس توزین شدند. میـزان پایـداری فـیلم‌هـا در محلول‌های اسیدی و قلیـایی بـر اسـاس درصـد حلالیـت آن‌هـا در محلول‌های مذکور تعیین شد.

نفوذپذیری به بخار آب

میزان نفوذپذیری به بخار آب فیلم‌ها بر اساس استاندارد ASTM E96 (2001) و به روش دیسکانت تعیین شد.

دسیکاتور داخل اینکوباتور 25 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و به مدت 7 روز در فواصل زمانی معـین (3 سـاعت) تـا مـدت زمـان 12 ساعت ظروف توزین شدند. میزان نفوذپـذیری بـه بخـار آب wvp از رابطه3، محاسبه شد:

در این رابطه m میزان افزایش وزن ظروف بعد از گذشـت زمـان آزمون، L ضخامت فیلم، A مساحت موثر فیلم، t مدت زمان آزمون و Δp تفاوت فشار بیرون ودرون ظروف آزمایش می‌باشد.

$$\text{WVP} = \frac{m.l}{A.t.\Delta p}\left[\frac{g.mm}{m^2.d.kpa}\right] \qquad (3)$$

تعیین میزان عبور نور و شفافیت فیلم‌ها

ویژگی ممانعت‌کنندگی در برابر نور مرئی در فیلم‌ها با استفاده از روش Yan و همکـاران (2011) و بـا اسـتفاده از دسـتگاه UV-Vis اسپکتروفوتومتر (CAMSPEC M550، انگستان) در طول موج 600 نانومتر اندازه‌گیری شد. بـدین منظـور قطعـات 1×4 سـانتی‌متـری از فیلم‌ها بریده و ضخامت آن‌ها در 5 نقطه در امتداد فیلم اندازه‌گیـری شد. سپس قطعه فیلم در دیواره شفاف داخل سـل کـوارتزی دسـتگاه قرار داده شده و میزان جذب نمونه قرائت شـد. شـفافیت از رابطـه 4، قابل محاسبه است (Han & Floros, 1997):

$$\text{Transparency} = \frac{A600}{X} \qquad (4)$$

در این معادله A600 میزان جذب در طول موج 600 نانومتر و X متوسط ضخامت فیلم بر حسب میلی‌متر می‌باشد.

شاخص *L روشنایی نمونه، شاخص *a قرمزی نمونه و شاخص

b* زردی نمونه در دو تکرار اندازه‌گیری شد. اختلاف رنگ کل (ΔE) بر اساس فرمول شماره 5، و روش Abdollahi و همکاران (2012) محاسبه شد. اندازه‌گیری پارامترهای رنگی با استفاده از دستگاه هانتر لب Konica Minolta (Chroma meter CR410، ژاپن) انجام شد.

$$\Delta E= \sqrt{(\Delta L *)2 + (\Delta a *)2 + (\Delta b *)2} \quad (5)$$

تعیین ویژگی‌های مکانیکی فیلم‌ها

ویژگی‌های مقاومت به کشش (TS) و درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی (E٪) بر اساس استاندارد، ASTM D882-02 و به‌وسیله دستگاه بافت‌سنج LLOYD (RS-232، AMETEK، آمریکا) اندازه‌گیری شد. برای انجام آزمایشات فاصله بین دو فک قبل از شروع آزمون 50 میلی‌متر، سرعت حرکت فک‌ها 50mm/min و Load cell 500 N تنظیم شد. مقاومت به کشش (TS) و درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی (E%) با روابط 6 و 7 ذیل تعیین شدند:

$$\text{Tensile strength} = \frac{\text{Maximum Load}}{\text{Cross sectional area of samples}}[\text{mp}] \quad (6)$$

$$\%E = \frac{\text{Elongation at breaking pointA600}}{\text{Original length}}[mm] \quad (7)$$

در این رابطه Maximum Load بیشینه نیروی ثبت شده به فیلم بر حسب نیوتن و Cross sectional area of samples سطح مقطع عرضی اولیه فیلم بر حسب متر مربع، Elongation at breaking point مقدار افزایش طول نقطه پارگی بر حسب میلی‌متر و Original length طول اولیه نمونه بین دو فک (10میلی‌متر در این تحقیق) می‌باشد.

آزمون‌های میکروبی

فعال‌سازی و تهیه اسپور کپک

به‌منظور فعال‌سازی، کپک را در پلیت حاوی محیط کشت PDA به‌صورت سطحی کشت داده و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 تا 7 روز تا رشد کامل و ظاهر شدن کلنی‌ها نگهداری شدند. سپس کپک در لوله حاوی محیط کشت PDA که به‌صورت شیب‌دار (SLANT) ریخته شده بود کشت داده شد. لوله‌ها به مدت 7روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد تا کپک‌ها رشد کرده و تولید اسپور گرمخانه‌گذاری شدند.

جهت جدا کردن اسپورها ، در هر لوله کشت تعدادی گوی شیشه‌ای استریل همراه با حدود 10میلی‌لیتر توئین 80 استریل (0/1 درصد) ریخته و پس از بستن درب لوله‌ها، چند دقیقه هم‌زده شدند تا اسپورها در اثر برخورد با گوی‌ها از سطح کلونی کنده شده و وارد محلول شوند. سپس محلول حاصل توسط کاغذ صافی شماره 1 در شرایط استریل صاف گردیدند. محول حاوی اسپور توسط محلول توئین 80 (0/1 درصد) رقیق گردید سپس با لام هموسایتومتر شمارش شدند تا سوسپانسیونی با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر به‌دست آید (Cheragh Ali, *et al*., 2007).

تعیین MIC به روش رقت در آگار

برای این منظور مقدار مشخصی از محیط کشت PDA استریل با دمای 45 درجه سانتی گراد با غلظت‌های مختلف اسانس شیره درخت بنه (صفر، 500، 1000، 1500، 2000، 2500، 3000، 3500، 4000 پی‌پی‌ام) تهیه شد و در پلیت توزیع گردید، سپس یک حلقه میسلیومی از حاشیه کشت 7روزه کپک *پنی سیلیوم اکسپانسوم* در مرکز هر پلیت قرار داده شد. میزان بازدارندگی برای هر غلظت از اسانس در 3 تکرار انجام شد و غلظت صفر (محیط کشت بدون اسانس) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پلیت‌ها به مدت 10روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و قطر کلنی‌ها روزانه و تا زمانی که تمام قطر پلیت توسط کپک پوشانده شود اندازه‌گیری شدند (Tripathi, *et al*., 2008).

درصد مهارکنندگی بر اساس قطر هاله شفاف با استفاده فرمول 6 محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار رشد}(\%) = \frac{dc-ds}{dc} \times 100 \quad (8)$$

dc= میانگین قطر رشد در نمونه شاهد
ds= میانگین قطر در نمونه تحت تیمار

تعیین حداقل غلظت کشنده (MFC)

به‌منظور بررسی غلظت قارچ‌کشی Fungicide اسانس، تیمارهایی که رشد کپکی در آن‌ها مشاهده نگردید، به‌وسیله لوپ استریل حلقه میسلیومی آن پلیت را به محیط کشت PDA انتقال داده شد و در دمای 25 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و رشد یا عدم رشد کپک‌ها پس از یک هفته بررسی می‌گردد (Tripathi, *et al*., 2008).

تعیین فعالیت ضدمیکروبی فیلم‌های تولیدی

بدین منظور از روش Film disk agar diffusion assay استفاده شد. در این روش فیلم‌ها با غلظت‌های (1000، 2000، 3000، 4000 پی‌پی‌ام) اسانس، را به‌صورت دیسک‌هایی با قطر 6 میلی‌متر برش داده شد و در مرکز پلیت‌های حاوی محیط کشت PDA که قبلا با سوسپانسیون اسپورهای کپک با غلظت 10^6 CFU به ازای هر 20 میلی‌لیتر از حجم سوسپانسیون تلقیح شده بود قرار گرفتند. پلیت‌ها را به مدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و بعد از زمان 48 ساعت قطر مناطق بازداری با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. تمامی غلظت‌ها در 3 تکرار انجام شدند و

غلظت صفر (فیلم بدون اسانس) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد (Gomez-Estaca *et al*., 2010).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این پژوهش، از طرح کاملا تصادفی در قالب آزمون فاکتوریل حداقل با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها با آزمون‌های ANOVA و توکی استفاده گردید. تیمارهای این تحقیق 1- غلظت اسانس بنه در چهار سطح در تهیه فیلم wvp و 2- بررسی اثر ضدمیکروبی اسانس بنه در 8 سطح بر روی کپک *پنی سیلیوم اکسپانسوم* در سطح معنی‌دار 5% استفاده شد. آنالیز واریانس نتایج به‌دست آمده با استفاده از SPSS/17 استفاده شد، همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار EXCEL استفاده شد.

نتایج و بحث

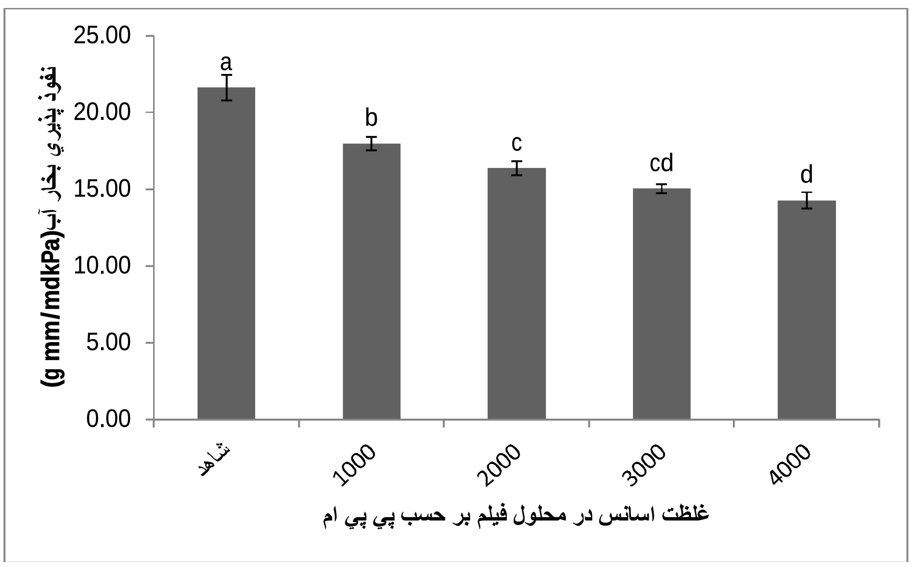
ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی

ضخامت و دانسیته

از آنجا که بسیاری از ویژگی‌های فیزیکی و مکانیکی فیلم‌ها تحت تاثیر میزان ضخامت آن‌ها قرار می‌گیرد (Wu *et al*., 2009)، در این مطالعه ضخامت فیلم به دقت کنترل شد، فیلم‌های به‌دست آمده ضخامت کمی داشته و به آسانی ازسطح پلیت‌ها جدا شدند و در انواع نمونه‌های تولید شده، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت. به‌طور میانگین ضخامت فیلم‌ها بین 0/222 تا 0/226 میلی‌متر اندازه‌گیری شد. با افزایش مقدار اسانس، ضخامت فیلم‌ها نیز افزایش داشت که به دلیل محبوس شدن ریز قطره‌های اسانس در فیلم می‌باشد (Ahmad *et al*., 2012؛ Bahram *et al*., 2014). همچنین کاهش بسیار جزئی در دانسیته فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر با افزایش غلظت اسانس به دلیل ماهیت روغنی آن مشاهده شد.

میزان نفوذپذیری به بخار آب

میزان نفوذپذیری به بخار آب تعیین شده از نمونه‌های فیلم مورد آزمون در شکل 1، نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت اسانس میزان نفوذپذیری به بخارآب به‌طور معنی‌داری کاهش یافت (P<0/05). افزودن اسانس به ماتریس پلیمری فیلم پروتئین آب پنیر باعث بهبود خواص WVP در فیلم زیست تخریب‌پذیر شد (Sanchez-Gonzalez *et al*., 2012). به‌طور کلی عبور بخار آب از طریق ترکیبات آب دوست پروتئین فیلم رخ می‌دهد و به نسبت ترکیبات آب‌گریز به ترکیبات آب دوست بستگی دارد (Norajit *et al*., 2010). خاصیت آب‌گریزی اسانس می‌تواند باعث افزایش آب‌گریزی فیلم پروتئین آب پنیر شود. (Rojes-Grau *et al*., 2007) نشان دادند که افزودن اسانس پونه کوهی در سطح 1/5%، به دلیل تغییر نسبت ترکیبات آب دوست به ترکیبات آب گریز، می‌تواند باعث کاهش WVP فیلم زیست تخریب‌پذیر پوره سیب شود.

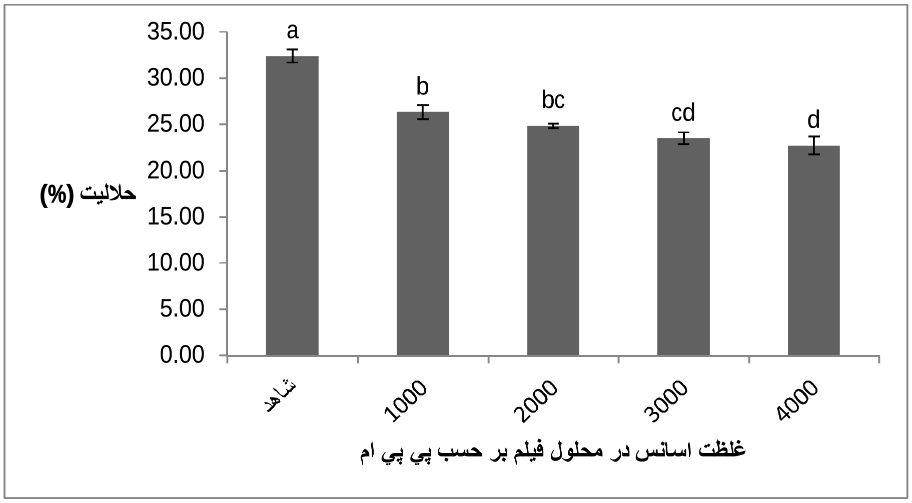


شکل 1- اثر غلظت اسانس صمغ بنه بر روی نفوذپذیری بخار آب در فیلم پروتئین آب پنیر

میزان حلالیت در آب

با افزایش غلظت اسانس در ساختار فیلم پروتئین آب پنیر میزان حلالیت در آب فیلم‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که با نتایج اجاق و همکاران (2010)، مطابقت می‌کند که نشان دادند با افزایش

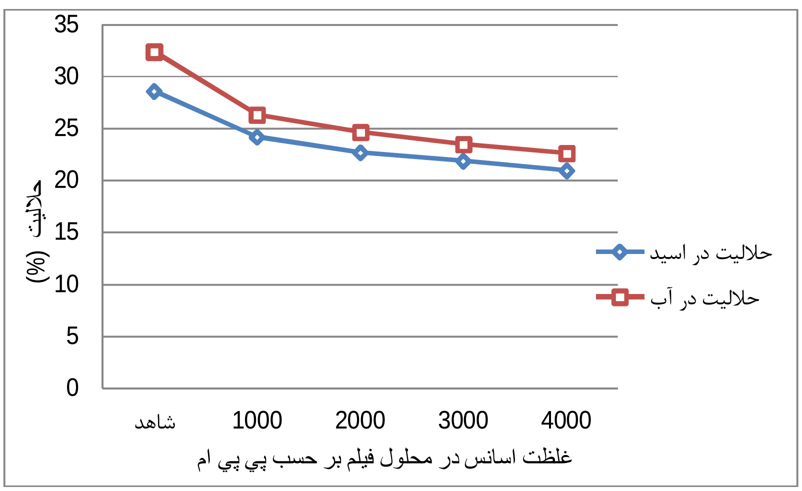
اسانس روغنی دارچین در ساختار هیدروکلوئیدی فیلم سبب کاهش حلالیت در آب فیلم تولیدی می‌شود. که به دلیل افزایش خاصیت آب‌گریزی فیلم می‌باشد.



شکل 2 -اثر غلظت اسانس بر روی میزان حلالیت در آب، فیلم پروتئین آب پنیر

پایداری در محلول‌های اسیدی و قلیایی

همانطور که در شکل 3، مشخص است محیط قلیایی باعث افزایش حلالیت فیلم به نسبت حلالیت در آب شده است. تحقیقات نشان داده‌اند که پروتئین‌ها در محیط قلیایی دچار چهار نوع واکنش هیدرولیز می‌شوند که یکی از مهم‌ترین آن‌ها هیدرولیز باندهای آمیدی در گلوتامین و آسپاراژین است. در محیط کمی قلیایی، دآمید شدن باند آمیدی به سرعت اتفاق می‌افتد. یون هیدروکسید به گروه کربونیل آمید متصل شده و سبب جدا شدن گروه NHR_2– می شود که این امر سبب افزایش حلالیت پروتئین خواهد شد (Whitaker *et al.*, 1983).



شکل 3- اثر غلظت اسانس بر میزان پایداری فیلم پروتئین آب پنیر در اسید و قلیا

زمانیکه pH محلول پروتئین، 2 یا کمتر از آن است، پروتئین دارای حداکثر بار مثبت خالص است. با افزایش pH، گروه‌های کربوکسیل بیشتر یونیزه می‌شوند (دارای بار منفی می‌شوند) تا رسیدن به نقطه ایزوالکتریک (pI) که pH منحصر به‌فرد برای هر پروتئین است. در این نقطه، بار خالص روی پروتئین، صفر است. در این نقطه تعداد بارهای مثبت و منفی با هم برابرند. با افزایش بیشتر pH،

پروتئین دارای بار منفی بیشتری می‌شودکه به دلیل یونیزاسیون هرچه بیشتر گروه‌های کربوکسیل، گروه‌های سولفیدریل و گروه‌های تیروزین و همچنین خنثی شدن بار مثبت گروه‌های ایمیدازول، گروه‌های آمینو و در نهایت گروه‌های گوانیدینو می‌باشد. در مجموع فیلم حاصل از پروتئین آب پنیر همراه اسانس صمغ بنه بیشترین پایداری را به‌ترتیب در محلول‌های اسیدی و آب و محلول‌های قلیایی نشان داد. به‌طوریکه در مورد حلالیت فیلم در قلیا این عدد از 35/7 به 25/2، در محیط آبی از 32/46 به 22/66 و در محیط اسیدی از 28/6 به 21 کاهش نشان داده است.

شفافیت

در بررسی آزمون شفافیت تغییر معنی‌داری در میزان این شاخص در فیلمهای تولیدی با غلظت‌های مختلف نشان نداد (جدول 1). با افزایش غلظت اسانس، شفافیت فیلم یک کاهش جزیی از 1/2 در نمونه شاهد به 1/13 در نمونه با غلظت 4000 پی‌پی‌ام اسانس، مشاهده گردید که البته این کاهش معنی‌دار نبود ($p<0.05$). دلیل این کاهش شفافیت را می‌توان به ترکیبات فنولی موجود در اسانس نسبت داد که در طول موج‌های پایین توانایی جذب نور را دارند. همچنین این پدیده را می‌توان به پراکنش نور نسبت داد که توسط توزیع قطرات چربی (اسانس روغنی اضافه شده به فیلم) با ضریب شکست متفاوت با فاز پیوسته، در سراسر شبکه فیلم، به‌وجود آمده است (Shojaee-Aliabadi, 2013). این مسئله را احتمالاً، می‌توان به ماهیت اسانس نسبت داد. از طرف دیگر فاکتور ΔE، که نشان‌دهنده بزرگی اختلاف رنگ می‌باشد، با افزودن اسانس به‌طور معنی‌داری، افزایش می‌یابد. در تحقیق حاضر این فاکتور از 16/74 به 28/51 افزایش نشان داد (Sobral *et al*., 2001). فاکتور *L، با افزایش غلظت اسانس کاهش نشان داد و فاکتور *b در کل یک افزایش معنی‌داری ($p<0.01$) از 12/03 در نمونه فاقد اسانس به 23/69 در نمونه با 4000 پی‌پی‌ام اسانس مشاهده شد.

جدول 1- اثر غلظت اسانس صمغ درخت بنه بر فاکتورهای شفافیت و پارامترهای رنگ

غلظت اسانس(پی‌پی‌ام)	شفافیت(T)	L*	a*	b*	ΔE
نمونه شاهد	1/20± 0/08[a]	84/38± 0/07[c]	-2/185±0/007[bc]	12/03±0/36[b]	16/74±0/36[b]
1000	1/07± 0/03[ab]	85/12±0/01[ab]	-2/345±0/007[c]	11/755±0/007[b]	16/38± 0/01[b]
2000	1/19± 0/04[a]	84/48±0/41[a]	-2/06±0/19[b]	11/27±0/77[b]	15/96± 0/83[b]
3000	0/92± 0/08[b]	84/62±0/04[bc]	-2/13±0/02[bc]	12/105±0/17[b]	16/76± 0/18[b]
4000	1/13± 0/06[a]	81/47±0/14[d]	-1/17±0[a]	23/69±0/36[a]	28/51± 0/4[a]

ارزیابی ویژگی‌های مکانیکی

تعیین مقاومت به کشش

داده‌های حاصل از آزمایش مکانیکی نشان داد (جدول 2) که مقاومت به کشش فیلم‌ها با افزایش اسانس به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<0.05$) این پدیده به‌وسیله اثر پلاستیسایزری اسانس‌ها در غلظت بالاتر، قابل توضیح است.

جدول 2- اثر غلظت اسانس صمغ درخت بنه بر مقاومت به کشش ومیزان درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی فیلم

غلظت اسانس (پی‌پی‌ام)	مقاومت به کشش (مگاپاسکال)	درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی فیلم (میلی‌متر)
شاهد	8/2±0/3[a]	28±0/5[c]
1000	6/53±0/25[b]	33/4±1/12[b]
2000	5/88±0/33	36±0/7[a]
3000	5/57±0/45[c]	36/6± 1/3[a]
4000	5/4±0/4 [c]	36/9±0/66[a]

Broumand و همکاران (2011) گزارش دادند که علاوه بر چربی، افزودن اسانس آویشن شیرازی به فیلم کازئینات سدیم منجر به کاهش مقاومت به کشش در فیلم تولیدی شد. دناتوراسیون پروتئین آب پنیر از طریق بهبود تعامل بین پیوندهای دی سولفیدی و هیدروژنی، باعث کاهش مقاومت به کشش ریزمولکول‌های زنجیره‌های پروتئینی می‌شود (Oses *et al*., 2009). ممکن است افزودن ترکیبات روغنی اسانس، باعث ایجاد ساختاری ناهمگن در فیلم شود که موجب کاهش مقاومت کششی آن شده است

تعیین درصد ازدیاد طول تا نقطه پارگی

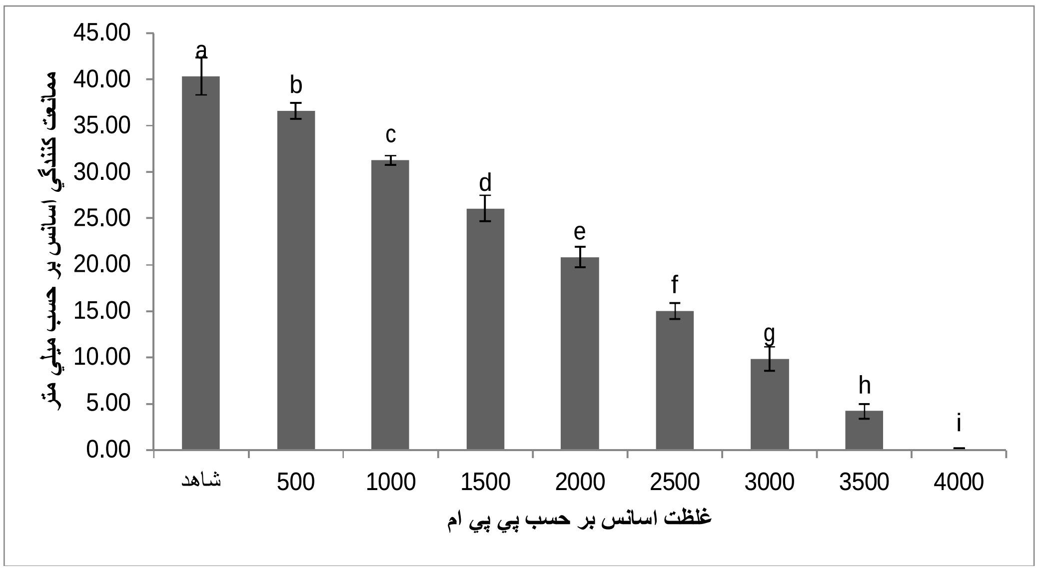
همانطور که نتایج در جدول 2 نشان داده شده است، کمیت ازدیاد طول تا نقطه پارگی با افزایش غلظت اسانس به‌طور معنی‌داری

افزایش پیدا کرد ($P<0.05$). این نشان می‌دهد که اسانس‌ها دارای نقش نرم‌کننده نیز هستند (Pranoto *et al.*, 2005). Zinoviadou و همکاران (2010) گزارش دادند که با زیاد شدن درصد اسانس پونه کوهی در فیلم‌های زیست تخریب‌پذیر حاصل از پروتئین آب پنیر، درصد ازدیاد طول این فیلم زیست تخریب‌پذیر افزایش می‌یابد که دلیل آن را تضعیف پیوندهای درون شبکه‌ای فیلم گزارش دادند. به‌طور کلی، پارامترهای مکانیکی در مطالعات مختلف، به‌صورت متفاوتی تحت تاثیر قرار می‌گیرند که وابسته به ویژگی و نوع ترکیبات لیپیدی، غلظت ترکیبات چربی افزوده شده و توزیع اندازه ذرات آنها می‌باشد. حضور یک فاز لیپیدی منجر به از هم گسیختن نظم در داخل ماتریس پروتئین آب پنیر شده و در نهایت باعث اختلاف در پارامترهای کشش می‌گردد (Galus & Kadzińska, 2016).

اثر ضدمیکروبی اسانس صمغ درخت بنه

تعیین میزان MIC

در شکل 4، اثر غلظت‌های مختلف اسانس بر مهار رشد کپک نشان داده شده است. تمامی غلظت‌های مورد بررسی تاثیر معنی‌داری ($P<0.05$) بر رشد کپک داشته و نتایج حاصل نشان می‌دهد با افزایش غلظت اسانس اثر مهارکنندگی افزایش و قطرکلونی مربوط به کپک کاهش می‌یابد. کاهش رشد کپک تا غلظت 3500ppm ادامه داشت و غلظت مهارکنندگی اسانس 4000ppm به‌دست آمد. غلظت 4000ppm دارای 100% اثر مهارکنندگی بر روی رشد بوده و در طول 7 روز هیچ رشدی مشاهده نشد.



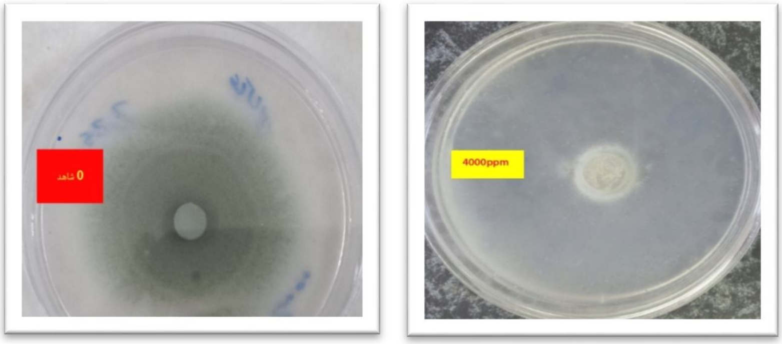
شکل 4- اثر غلظت اسانس در خاصیت ضدمیکروبی اسانس صمغ درخت بنه بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*

Yahyazadeh و همکاران (2008) اثر اسانس میخک، رازیانه و آویشن و مریم گلی را بر رشد *پنی‌سیلیوم دیجیتاتوم* مورد تحقیق قرار دادند، آویشن و میخک در غلظت 4000ppm رشد قارچ را به‌طور کامل مهار کرد، اما رازیانه و مریم گلی فاقد مهارکنندگی بر روی این قارچ بودند. اکرمی و همکاران (1391) اثر اسانس آویشن شیرازی را بر رشد *پنی‌سیلیوم سیترنیوم* مورد بررسی قرار دادند، که در این بررسی غلظت 4000ppm به‌طور کامل رشد قارچ را مهار کرد. خاصیت ضدقارچی اسانس‌ها بستگی به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن دارد و تفاوت در فعالیت ضدقارچی اسانس‌های گیاهی به اجزای تشکیل‌دهنده آن مرتبط است، به‌طوری که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به‌صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیبات فعالیت ضدقارچی اسانس را باعث می‌شود تا در غلظت معینی تأثیر قابل قبولی داشته باشد (Aksoy *et al.*, 2006).

نتایج تحقیقات Hazell و Sharifi (2011) و Ramezani و همکاران (2004) و Ben Douissa و همکاران (2005) نشان می‌دهد که α-pinene یک ترکیب ضدمیکروبی بسیار مهم در اسانس برگه و صمغ گونه pistacia می‌باشد. با توجه به اینکه مقدار ترکیب فوق در *P.atlantica* subsp *kurdica* تقریبا 70 درصد می‌باشد، بنابراین ممکن است یکی از دلایل بیشتر بودن قدرت بازدارندگی اسانس pistacia وجود α-pinene باشد (Aksoy *et al.*, 2006) و (Habibi Najafi *et al.*, 2014).

اندازه نواحی ممانعت‌کنندگی از رشد کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*

توسط اسانس صمغ درخت بنه در جدول 2 ارائه شده است.



(الف) (ب)

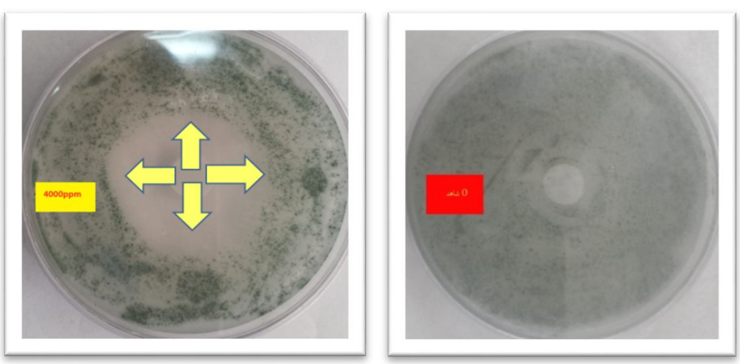
شکل 5- نمایش اثر ضدمیکروبی اسانس صمغ درخت بنه بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*:
(الف): محیط کشت بدون اسانس، (ب) غلظت 4000 ppm اسانس در محیط کشت.

جدول2- اندازه نواحی ممانعت‌کنندگی از رشد کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* و درصد بازدارندگی توسط اسانس صمغ درخت بنه

غلظت اسانس در محیط کشت(ppm)	رشد	
	قطر کلنی (mm)[a]	% بازدارندگی
0	40/32	0
500	36/66	9
1000	31/34	22/2
1500	26/12	35/2
2000	20/87	48/2
2500	15/05	62/6
3000	9/77	75/7
3500	4/51	88/8
4000	0	100

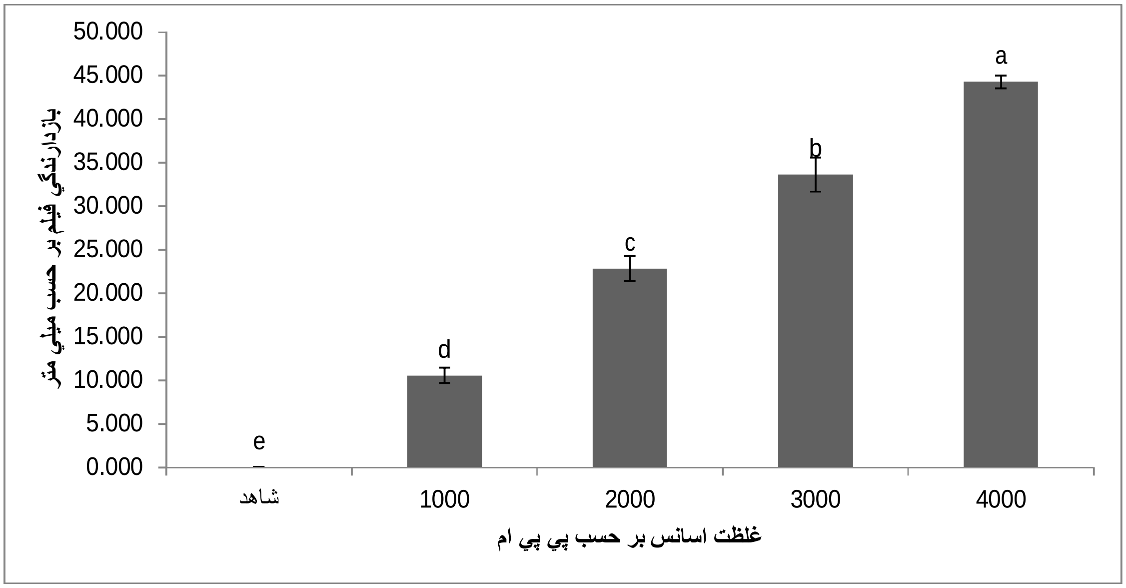
اثر ضدمیکروبی فیلم زیست تخریب‌پذیر پروتئین آب پنیر به‌همراه اسانس صمغ بنه

اثر غلظت در فعالیت ضدمیکروبی فیلم زیست تخریب‌پذیر تهیه شده از پروتئین آب پنیر حاوی اسانس صمغ بنه بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* معنی‌دار بود ($p<0.05$). (شکل 6 و 7).



(الف) (ب)

شکل 6- نمایش اثر ضدمیکروبی فیلم زیست تخریب‌پذیر پروتئین آب حاوی اسانس صمغ درخت بنه بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*
(الف): غلظت 4000 ppm اسانس در فیلم پروتئین آب پنیر، (ب) فیلم پروتئین آب پنیر بدون اسانس



شکل 7- اثر ضدمیکروبی فیلم زیست تخریب‌پذیر پروتئین آب حاوی اسانس صمغ درخت بنه بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم*

در این آزمون فیلم شاهد (بدون اسانس) هیچ هاله بازداری را نشان نداد، این نتایج موافق با نتایج به‌دست آمده توسط Cagri و همکاران (2001) در مورد فیلم‌های پروتئین آب پنیر می‌باشد. در حالیکه فیلم‌های دارای اسانس دارای هاله بازداری مشخصی بودند. اندازه‌گیری فعالیت ضدمیکروبی با استفاده از منطقه بازداری اطراف فیلم، به سرعت انتشار ماده ضدمیکروب از فیلم، اندازه و شکل فیلم بستگی دارد (Pranoto *et al*., 2005).این مطلب نشان دهنده این است که ترکیبات ضدمیکروبی از فیلم تهیه شده به محیط کشت مهاجرت کرده و از رشد میکروارگانیسم در نواحی فیلم مورد نظر در محیط آگار جلوگیری می کند.

نتیجه‌گیری

در ارزیابی خواص فیزیکی، افزودن اسانس صمغ بنه به فیلم، نفوذپذیری به بخار آب، به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و در غلظت 4000ppm از اسانس کمترین میزان نفوذپذیری به بخار آب ($14/24\ g\ mmm^{-1}\ d^{-1}\ kpa^{-1}$) را نشان داد، که در مقایسه با فیلم شاهد، کاهش میزان نفوذپذیری به بخار آب را داشته است. از آنجایی که فیلم پروتئین آب پنیر ماهیت آب دوست دارد، خصوصیات ضد رطوبتی مطلوبی نخواهد داشت و اضافه نمودن این اسانس به فرمولاسیون فیلم ویژگی‌های ضد رطوبتی فیلم را بهبود بخشید. با افزایش غلظت اسانس در ساختار فیلم پروتئین آب پنیر، میزان مقاومت به کشش فیلم به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و بالعکس باعث افزایش معنی‌دار ازدیاد طول تا نقطه پارگی در فیلم شد. میزان حلالیت در فیلم دارای اسانس 4000ppm، (22/66%) بود که در مقایسه با فیلم شاهد با 32/46% کاهش چشمگیری به همراه داشته که خود فاکتور مهمی برای زیست تخریب‌پذیری فیلم‌ها در بسته‌بندی مواد غذایی محسوب می‌شود. در ارزیابی خواص ضدمیکروبی اسانس صمغ بنه در محیط PDA بر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* مشاهده شد افزایش غلظت اسانس، از رشد کپک جلوگیری کرد به‌طوری که در غلظت 4000ppm هیچ‌گونه رشدی از کپک بر روی سطح پلیت مشاهده نشد. به همین ترتیب فیلم پروتئین آب پنیر حاوی اسانس صمغ بنه در محیط کشت در برابر کپک *پنی‌سیلیوم اکسپانسوم* بازدارندگی از خود نشان داده است و با افزایش غلظت اسانس در ساختار فیلم قطر هاله عدم رشد کپک افزایش یافته و تأثیرات بازدارندگی مناسبی در برابر کپک مورد آزمون مشاهده شد. به عبارت دیگر فرمولاسیون فیلم پروتئین آب پنیر حاوی اسانس صمغ بنه کارایی مطلوبی در خصوص انتشار ماده ضد میکروب مورد نظر داشته است.

منابع

Abdollahi, M., Rezaei, M. & Farzi, G., 2012, A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan, Journal of Food Engineering, 111(2), 343-350

Ahmad, M., Benjakul, S., Prodpran, T. & Agustini, T. W., 2012, Physico-mechanical andantimicrobial properties of gelatin film from the skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils, Food Hydrocolloids, 28(1), 189-199.

Akrami Mohajer,F., Akhoonzadeh Basti, A., Khosravi, A. R., Gandomi, H., Ebrahim Nejad, H. 1391. Growth inhibition and morphological alterations to Penicillium citrinum in response to Zataria multiflora boiss. Essential oil. *Journal of Veterinary Research*. 67(4):307-312.

Aksoy A, Duran N, Koksal F. In vitro and in vivo antimicrobial effects of mastic chewing gum against Streptococcus mutans and mutans streptococci. Archives of Oral Biology 2006; 51:476-481

Alizadeh, V., Barzegar, H., Nasehi, B., Samavati, V.1396. Characterization of physical and antimicrobial properties of chitosan edible films containing Pistacia atlantica gum essence. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*.13 (4):584-593.

Alma, M. H., Nitz, S., Kollmannsberger, H., Digrak, M., Efe, F. T., and Yilmaz, N.2004.Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (Pistacia vera L.). Journal of Agriculture and Food Chemistry. 52, 3911- 3914.

ASTM, 2001. Standard methods of test for water vapor transmission of materials in sheet from, method ASTM E 96-00. In Annual book of ASTM standard. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Material.

ASTM, 2002. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, D882-02. In Annual book of ASTM stsndards. Philadephia, PA: American Society for Testing and Material.

Bahram, S., Rezaei, M., Soltani, M., Kamali, M., ا, S.M., Abdollahi, M.2014.Whey Protein Concentrate Edible Film Activated with Cinnamon Essential Oil.Journal of Food Processing and Preservation. 38(3), 1251-1258.

Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, J. F., Akssira, M., Mellouki, F., Belgarrabe, A. & Blázquez, M. A., 2005, Chemical composition of the essential oils of Pistacia atlantica Desf Journal of Essential Oil Research, 17(1), 52-54.

Bekhradi, R and Khayat Kashani, M. 1385. Therapeutic Applications of Essential oils. Morsal Pblication. pp:28-32.

Ben Douissa F, Hayder N, Chekir-Ghedira L, Hammami M, Ghedria K, Mariotte AM and et al. 2005. New study of the essential oil from leaves of Pistacia lentiscus L. Anacardiaceae from Tunisia. Flavor and Fragrance Journal. 20: 410-414.

Broumand, A., Emam-Djomeh, Z., Hamedi, M. and Razavi, S.H. 2011. Antimicrobial, water vapour permeability, mechanical and thermal properties of casein based Zataria multiflora Boiss. Extract containing film. LWT Food Sci. Technol. 44, 2316–2323.

Cagri, A., Ustunol, Z., and Ryser, E.T., 2001. Antimicrobial, mechanical, and moisture barrier properties of low pH whey protein-based edible films containing p-aminobenzoic or sorbic acids. Journal of Food Science 66 (6), 865-870.

Castola, V., Bighelli, A., and Casanova, J. 2000.Intraspecific chemical variability of the essential oil of Pistacia lentiscus L. from Corsica. Biochemical Systematics Ecology. 28, 79-88.

Chae, S., and Heo, T.R., 1997. Production and properties of edible films using whey protein.Biotechnology and Bioprocessing Engineering, 2, 122-125.

Cheragh Ali, A. M., Yazdanpanah, H., and Doraki, N. "Incidence of aflatoxins in Iran pistachio nuts"Food and Chemical Toxicology, 2007, 45: 812-816.

Delazar, A., Reid, R. G. and Sarker, S. D. 2004.GC-MS Analysis of the Essential Oil from the Oleoresin of Pistacia atlantica var. mutica. Chemistry of Natural Compounds. 40, 24-27.

Farhoosh, R., Tavakoli, J., and Haddad Khodaparast, M. H. 2008.Chemical Composition and Oxidative Stability of Kernel Oils from Two Current Subspecies of Pistacia atlantica in Iran. Journal of the American Oil Chemists' Society. 85(8), 723-729.

Galus, S., Kadzińska, J. 2016. Whey protein edible films modified with almond and walnut oils. Food Hydrocolloids. 52, 78-86.

Gomez-Estaca, J., Lopez delacey, A., Lopezcaballero, M.E., Gomez-Guillen, M.C. andntero, P.2010. Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agent’s forfish preservation. Food Microbiology.27, 889–896.

Habibi Najafi, M. B., Hajimohamadi Farimani, R., Tavakoli, J., and Madayeni. S. 2014. GC-MS Analysis And Antimicrobial Activity Of The Essential Oil Of Trunk Exudates OF Pistacia atlantica var. mutica, Chemistry of Natural Compounds, Vol. 50, No. 2,376–378.

Han, J. H., & Floros, J. D., 1997. Casting antimicrobial packaging films and measuring their physical properties and antimicrobial activity.Journal of Plastic Film and Sheeting, 13:287-298.

Hatamnia, A. A., Abbaspour, N. & Darvishzadeh, R., 2014, Antioxidant activity and phenolic profile of different parts of Bene (Pistacia atlantica subsp. kurdica) fruits, Food chemistry, 145, 306-311.

Hu, G., Chen, J, 2009. Preparation and characteristics of oxidized potato starch films. Carbohydrate Polymer, 76:291-298.

Kumar, R., Mishra, A.K., Dubey, N.K. and Tripathi, Y.B. 2007. Evaluation of Chenopodium ambrosioides as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. International Journal of Food Microbiology. 115, 159–164.

Mgiatis, P., Melliou, E., Skaltounis, A., Chinou, I. B. and Mitaku, S.1999. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Pistacia lentiscus var. chia. Planta Medica., 65(8), 749-752.

Monaco, P., Previtera, L., and Mangoni, L.1982.Terpenes in Pistacia plants: A possible defence role for monoterpenes against gall-forming aphids. Phytochemistry, 21(9), 2408-2410.

Muller C M O, Yamashita F, Laurindo J B, 2008. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. Carbohydrate Polymer, 72:82-87.

Norajit, K., Kim, K.M. and Ryu, G.H. 2010. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. Journal of Food Engineering. 98, 377–384.

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H., and Hosseini, S.M.H., 2010a. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. Food Chemistry. 120, 193-198.

Oses, J., Fabregat-Vazquez, M., Pedroza-Islas, R.,Tomas, S.A., Cruzorea A. and Mate, J.I. 2009.Development and characterization of composite edible filmsbased on whey protein isolate and mesquite gum. Journal of Food Engineering.92, 56–62.

Ou, S., Kwok, K. C. and Kang, Y. 2004. Changes in in vitro digestibility and available lysine of soy protein isolate after formation of film. Journal of Food Engineering. 64, 301-305.

Pranoto, Y., S.K. Rakshit, V.M. Salokhe. 2005. Enhancing antibacterial activity of chitosan films by incorporating garlic, potassium sorbate and nisin. LWT, 38: 859-865.

Pérez-Gago, M.B and Krochta, J.M. 1999. Water vapor permeability of whey protein emulsion films as affected by pH. Journal of Food Science. 64(4):695-698.

Ramezani, M., Khaje-Karamoddin, M., and Karimi-Fard, V. 2004. Chemical Composition and Anti–Helicobacter pylori Activity of the Essential Oil of Pistacia vera. Pharmaceutical Biology. 42 (7), 488 - 490.

Ramos, O. L., Fernandes, J. C., Silva, S. I., Pintado, M. E., and Malcata, F. X. 2012. Edible Films and Coatings from Whey Proteins: A Review on Formulation, and on Mechanical and Bioactive Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 52:533–552.

Rojes-Grau,M.., Avena-Bustillos,R.J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P.R., Martin-Belloso, O., et al. 2007 Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate-apple puree edible films. Journal of food Engineering, 81, 634-641.

Romero-Bastida C A, Bello-Oerez L.A, Garcia M.A, Martino M.N, Solorza-Feria J, Zaritzky, N.E. 2005. Physicochemical and microstructural characterization of films prepared by thermal and cold gelatinization from non-conventional sources of starches.Carbohydrate Polymer, 60:235-244.

Sanchez-Gonzalez, L., Vargas, M., Gonzalez-Martinez, C., Chiralt, A. and Chafer, M. 2011.Use of essential oils in bioactive edible coatings.Food Engineering Review.3, 1-16.

Seydim, A.C. and Sarikus, G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. Food ResearchInternational. 39, 639–644.

Sharifi, M. S., and Hazell, S.L. 2011. GC-MS Analysis and Antimicrobial activity of the essential oil of the trunk exudates from Pistacia atlantica kurdica. Journal of Pharmaceutical Science and Research. 3 (8), 1364-1367.

Shojaee-Aliabadi, S., Hosseini, H., Mohammadifar, M. A., Mohammadi, A., Ghasemlou, M., Ojagh, S. M. & Khaksar, R. 2013. Characterization of antioxidant-antimicrobial κ Carrageenan films containing satureja hortensis essential oil, International journal of biological macromolecules. 52, 116-124.

Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C., Hubinguer, M. D., and Roques, M. A. 2001. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin-based edible films. Food Hydrocolloid. 15: 423-432.

Taran, M., Mohebali, M. and Esmaeli, J. 2010. In Vivo Efficacy of Gum Obtained Pistacia Atlantica in Experimental Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. Iranian Journal of Public Health, 39 (1), 36 -41.

Tripathi, P., Dubey, N. K. and Shukla, A. K. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mold of grapes caused by Botrytis cinerea. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:39–46.

Whitaker J.R., Feeney R. E., Sternberg. M.M. 1983. Chemical and physical modification of proteins by the hydroxide ion. C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 19(3): 173-212.

Wu H.X, Lia C.H, Chen. J.H. Chen Y, Anderson D.P, 2009, Structure and properties of starch-zirconium Sacc.World microbial Biotechnology 24:1445-1450.

Yahyazadeh M, Omidbeigi R, Zare R, Taheri H,2008.Effect of some essential oil on mycelial growth of Penicillium digitatum C., 2010 , Purification of a new antifungal compound produced by Lactobacillus plantarum AF1 isolated from kimchi , International Journal ofFood Microbiology, 129 , 56-63.

Yan Q, Hou H, Guo P, Dong H, 2011. Effects of extrusion and glycerol content on properties of oxidized and acetylated corn starch-based films. Carbohydrate Polymer, 87(1):707-712.

Zinoviadou,K., Koutsumanis, K.P., & Biliaderis,C,G. 2010. Physical and thermomechanical propertions of whey protein isolate films containing antimicrobial, and their effect against spoilage flora of fresh beef. Food Hydrocolloids, 24, 49-59.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 14, No. 4, Oct- Nov 2018, p.657-670

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 14، شماره 4، مهر- آبان 1397، ص. 670-657

Antimicrobial effect of WPC-based edible film containing mastic tree sap (*Pistacia atlantica Subsp. Kurdica*) essential oil on *Penicillium expansum*

S. Abbaspour Monjezi[1], M. R. Edalatian Dovom[2*], M. B. Habibi najafi[3], A. Koocheki[3]

Received: 2017.05.07
Accepted: 2017.09.11

Introduction: Nowadays, consumers prefer foods produced without synthetic preservatives. These chemical preservatives have been gradually replaced by natural preservatives in formulation of edible films and coating. Since, edible films can be applied as carriers of antimicrobial agents, so, these aforementioned ingredients can be incorporated in such films. Among edible films, protein-based films such as whey protein concentrate (WPC)-based films are more attractive because they also supply valuable nutrients and introduce acceptable mechanical resistance. On the other hand, these films present moderate barriers to moisture due to the hydrophilic nature of whey proteins. Essential oils (Eos) can be incorporated in to edible films in order to compensate (overcome) this defect. Since no published research has been found on integrating mastic tree sap (Pistacia atlantica sub sp. kurdica) essential oil into whey protein edible films, this essential oil was applied for WPC-based film in this research. Some species belong to Penicillium have been known as contaminants of dairy and fruit products. Among Penicillium sp., *P. expansum* is more popular for causing post-harvest damage of apples. In this study, our objective was focused on mechanical and anti-fungal properties of WPC-based films incorporated with mastic gum essential oil.

Materials and methods: WPC, mastic tree sap and *P. expansum* were obtained from Multi Milk Company, Kurdistan mastic Gum Company and Persian Type Collection Culture, respectively. Extraction of EO from mastic gum was accomplished using water distillation or hydro distillation with the help of Clevenger-type apparatus for 5 hours to obtain a pale yellow oil. Solution (10%w/w) of WPC in distilled water was prepared. Glycerol (as plasticizer) was added to WPC solution at a ratio of 1:1 WPC: Glycerol. Then concentrations of EO (1000, 2000, 3000 and 4000 ppm) was added to solution and mixed for 2 min. In the next step, some characteristics of film were measured including: thickness and density, water solubility, stability in acidic and alkaline solutions, water vapor permeability and light transmission / film transparency. Some mechanical properties of films such as tensile strength (TS) and elongation at break (%E) of films were also determined.

Regarding microbial assays, following the activation and preparation of fungi spore, MIC was determined using Agar Dilution Method. Determination of antimicrobial activity of film was performed according to film disk agar diffusion assay

Results & Discussion: With increasing essential oil concentration, film thickness exhibited increasing trend which was due to entrapment of micro-droplets of essential oil in film. Along with increasing EO concentration in film samples, WVP declined significantly (P-value<0.05).

Incorporating of essential oil of baneh in to WPC-based film formulation at a level of 4000ppm led to a reduction in WVP from 21.62 to 14.27 (g.mm/m.d.kpa). Regarding water solubility, with increasing of essential oil concentration in structure of whey protein film, water solubility of films experienced declining trend from 32.42% in control sample to 22.69 % in film with 4000ppm EO significantly (p<0.05). Alkaline solution caused increase of film solubility compared to water solubility. Also, no significant difference was seen in transparency of produced films with increasing essence concentration. Mechanical properties, including tensile strength experienced declining trend significantly (P<0.05) but, elongation at break showed an increase up to 36.9 mm with increasing of essential oil concentration to 4000 ppm. WPC-based film possessed antifungal effect on Potato Dextrose Agar (PDA) against Penicillium expansum. Increasing essential oil concentration in the film led to enhance the zone of inhibition significantly (P<0.05). Increasing of essential oil concentration inhibited the

1, 2 and 3. Former MSc Student, Associate Professor and Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
(*Corresponding Author Email: edalatian@um.ac.ir)

fungal growth so that no growth was seen at concentration of 4000 ppm in PDA medium. Similarly, WPC-based film containing mastic sap essential oil showed inhibitory effect on *P. expansum* in PDA medium and with increasing of EO concentration in film structure, clear zone of inhibition was developed. In other words, formulation of whey protein concentrated film containing essential oil presented suitable efficacy regarding to diffusion of respected antimicrobial compounds.

Keywords: Antimicrobial effect, Edible film, Oil of baneh, Whey protein